

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ



ВАСИЛИШИН РОКСОЛАНА ВАСИЛІВНА

УДК 576.343:582.282.232

**КОНСТРУЮВАННЯ ПОЛІПШЕНИХ ПРОДУЦЕНТІВ  
ЕТАНОЛУ ТА ГЛУТАТІОНУ У  
ДРІЖДЖІВ *OGATAEA POLYMORPHA***

03.00.07 – мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Львів – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі молекулярної генетики і біотехнології  
Інституту біології клітини НАН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
академік НАН України  
**Сибірний Андрій Андрійович**  
Інститут біології клітини НАН України,  
директор, завідувач відділу молекулярної  
генетики і біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, доцент  
**Осташ Богдан Омелянович**  
Львівський національний університет ім. Івана Франка,  
головний науковий співробітник лабораторії генетики,  
селекції та генетичної інженерії продуцентів  
антибіотиків, професор кафедри генетики та біотехнології

доктор медичних наук, професор  
**Корнійчук Олена Петрівна**  
Львівський національний медичний університет  
ім. Данила Галицького,  
завідувач кафедри мікробіології

Захист відбудеться 27 січня 2021 року о 15<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 35.246.01, Інститут біології клітини НАН України, 79005, м. Львів,  
вул. Драгоманова, 14/16

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітини НАН  
України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16

Автореферат розісланий 24 грудня 2020 року

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Т. М. Прокопів

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Питання забезпечення енергоносіями для будь-якої країни світу, в тому числі й для України, відноситься до сфери національної безпеки. Пошук альтернативних джерел енергії є першочерговою проблемою. Етиловий спирт, отриманий біоконверсією поновлювальної рослинної сировини, має значний потенціал для розвитку біоенергетики та розробки технологій утилізації відходів сільського господарства, деревообробної промисловості та побутових відходів. Етанол із біомаси, що застосовується як паливо, називають паливним етанолом або біоетанолом. На сьогодні практично весь етанол отримується шляхом мікробної ферментації з харчової сировини, зазвичай, цукру або крохмалю. Важливе економічне та екологічне значення має розроблення ефективних технологій для виробництва паливного етанолу з дешевої поновлюваної сировини - лігноцелюлозних залишків аграрної та деревообробної промисловостей. Однак вартість паливного етанолу з лігноцелюлозних відходів наразі занадто висока для їх впровадження в промислових масштабах. Тому поліпшення та удосконалення мікробних продуцентів цього спирту з нехарчової сировини є актуальним завданням.

Попередні дослідження з метою отримання рекомбінантних штамів, природньо ферментуючих ксилозу видів дріжджів *Ogataea polymorpha*, з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози, мали позитивний результат. Однак, залишились нез'ясованими низка лімітуючих чинників метаболізму зазначеної пентози. Тому у виконаній роботі представлено застосування відомих та розробку нових оригінальних підходів метаболічної інженерії для покращення високотемпературної алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha*.

Дана робота також ілюструє потенціал метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha* як перспективних продуцентів глутатіону та фізіологічну роль глутатіону за умов спиртового бродіння. На сьогодні, глутатіон є одним з найбільш досліджених антиоксидантів. Широке використання зазначеного трипептиду як активного компонента лікарських засобів, продуктів харчування та косметичних засобів, обумовлює постійне зростання попиту на глутатіон. Мікробіологічний синтез із використанням дріжджів є найпоширенішим методом виробництва глутатіону. Дріжджі *O. polymorpha* вирізняється високою стійкістю до різних стресових умов, викликаних важкими металами, ксенобіотиками та іншими забруднювачами, проте механізми регулювання спиртового бродіння за участю глутатіону залишаються невідомими. Метаболічна інженерія спрямована на створення надпродуцентів глутатіону та оптимізація технології його виробництва може задовільнити потреби світового ринку.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами: «Застосування метаболічної інженерії метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* для покращення алкогольної ферментації альтернативних джерел вуглецю (ксилози та гліцерину)» (№ держреєстрації 0114U000592, 2013-2017); «Комп'ютерне моделювання *in silico* як основа раціональної метаболічної інженерії дріжджів *Hansenula polymorpha* для поліпшення параметрів високотемпературної алкогольної

ферментації ксилози» проект № 6188 спільного конкурсу НАН України та Українського науково-технологічного центру (№ держреєстрації (0116U006364, 2015-2017); «Генетичні та біохімічні аспекти регуляції деяких катаболічних та анаболічних процесів у мікроорганізмів: алкогольна ферментація, катаболізму метанолу, біосинтезу флавінів, гліцерину, водню та глутатіону» (№ держреєстрації 0116U002209, 2018-2020); цільової програми наукових досліджень НАН України «Біопаливні ресурси і біоенергетика» (№ держреєстрації 0118U006196, 2018-2022).

Окремі розділи дисертаційної роботи виконувалися у рамках індивідуального гранту «Engineering of xylose transporters in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* for improvement of alcoholic fermentation», FEMS-GO-2018-225. Автор дисертаційної роботи є єдиним (FEMS-GO-2018-225) або одним із виконавців вищезгаданих досліджень.

**Мета і завдання дослідження.** Розробка та застосування підходів метаболічної інженерії для отримання штамів дріжджів *O. polymorpha* з підвищеною ефективністю високотемпературної алкогольної ферментації ксилози та підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. Здійснити посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/cat8Δ, отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції, що характеризується підвищеною продукцією етанолу з ксилози.
2. Сконструювати модифіковані форми транспортера Hxt1 *O. polymorpha* із заміною залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітінування) та заміною аспарагіну на аланін в положенні 358.
3. Отримати штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленням експресії ізоформ гена *HXT1*, що кодує нативну форму або модифіковані форми транспортера Hxt1, та дослідити вплив посилення експресії та делеції гена *HXT1* на ріст та ефективність ко-ферментації глюкози та ксилози дріжджів *O. polymorpha*.
4. Сконструювати штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7 Saccharomyces cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та дослідити вплив здійснених модифікацій на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha* під час алкогольної ферментації.
5. Сконструювати штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок посилення експресії гена транскрипційного активатора Met4.
6. Дослідити вплив підвищеного вмісту внутрішньоклітинного глутатіону на продуктивність алкогольної ферментації у *O. polymorpha*.

**Об'єкт дослідження:** продукція етанолу з ксилози та регуляція продукції глутатіону у дріжджів *O. polymorpha*.

**Предмет дослідження:** конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *O. polymorpha*, що здатні зброджувати ксилозу до етанолу та утворювати глутатіон.

**Методи досліджень.** У роботі використовувалися різноманітні генетичні, біохімічні та мікробіологічні методи дослідження. Конструювання рекомбінантних

векторів було здійснено за допомогою молекулярно-біологічних методів, таких як гідроліз ДНК ендонуклеазами рестрикції, елюція фрагментів ДНК з агарозного гелю, дефосфорилування лінеаризованих векторів, лігування вектора з вставкою та генетична трансформація бактерій та дріжджів. Для аналізу рекомбінантних штамів дріжджів використовували методи ПЛР та ПЛР у реальному часі. Здійснювали визначення активності низки ферментів у безклітинних екстрактах, а також параметрів алкогольної ферментації дріжджових штамів на різних субстратах та ін. У роботі широко використовувались методи комп'ютерного аналізу та комп'ютерні бази даних відомих генів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** З метою поліпшення споживання ксилози кілька підходів, які раніше використовувались для низькоафінних транспортерів глюкози у *S. cerevisiae*, вперше були успішно застосовані для транспортера Hxt1 *O. polymorpha*. Отримані результати мають важливе значення для розуміння особливостей етапу транспорту ксилози у мікроорганізмів, а також конструювання штамів дріжджів з покращеною ефективністю алкогольної ко-ферментації глюкози та ксилози. Крім того, вперше представлено дослідження механізму регуляції біосинтезу глутатіону за рахунок посилення експресії гена *MET4* із використанням штаму реципієнта з посиленою експресією гена *GSH2* у *O. polymorpha*. Встановлено зв'язок між підвищеною здатністю до накопичення глутатіону та ефективністю продукції етанолу за умов алкогольної ферментації. Одержані дані необхідні для оптимізації умов продукції глутатіону та розширення сучасного знання щодо механізмів регуляції його синтезу у дріжджів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Вперше встановлено, що в дріжджі *O. polymorpha* внаслідок посилення експресії модифікованих форм власного транспортера Hxt1, а також модифікованих гетерологічних транспортерів Hxt7 та Gal2 *S. cerevisiae*, покращується здатність споживати ксилозу під час зброджування глюкозно-ксилозних сумішей. Отримані результати мають важливе значення для розуміння особливостей етапу транспорту ксилози у дріжджів, а також для конструювання штамів з покращеною ефективністю алкогольної ко-ферментації глюкози та ксилози. Виявлено, що посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2*, які кодують пероксисомні ферменти трансальдолазу та дигідроксиацетонсинтазу, в геномі штаму *O. polymorpha* з покращеною продукцією етанолу з ксилози, підвищує нагромадження етанолу, що свідчить про участь цих ферментів в регуляції алкогольної ферментації ксилози. Доведено, що підвищення рівня внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок надекспресії гена транскрипційного активатора Met4 та гена першого фермента біосинтезу глутатіону *GSH2* покращує ефективність алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha* при 45 °C. Отримані результати вказують на зв'язок між підвищеною здатністю до накопичення глутатіону та ефективністю продукції етанолу під час алкогольної ферментації за умов підвищеної температури як стресового чинника та за наявності ксилози, що є менш ефективним для зброджування джерелом вуглецю порівняно з глюкозою. Одержані дані про участь транскрипційного активатора Met4 в регуляції синтезу глутатіону розширюють сучасні знання щодо механізмів регуляції синтезу цього трипептиду у дріжджів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом спільно з науковим керівником розроблено план проведення досліджень та визначено методи розв'язання поставлених завдань. Аналіз та обговорення результатів досліджень, а також підготовку публікацій за темою дослідження проведено разом із науковим керівником. Експериментальні дослідження, результати яких викладені в дисертації, проведені дисертантом самостійно або спільно з співавторами публікацій. Частину результатів спільних досліджень використано в дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук Куриленко О.О. (Kurylenko *et al.*, 2018). Автор висловлює щиру подяку науковому керівнику, співавторам публікацій та усім працівникам, хто долучився до отримання викладених в дисертаційній роботі результатів досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей. Результати роботи доповідались на XXVII Міжнародній конференції по генетиці та молекулярній біології дріжджів (Levico Terme, Italy, 2015), VI Міжнародній конференції молодих вчених «Human – Nutrition –Environment» (Rzeszow, Poland, 2016), V-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Одеса, Україна, 2016), XIV Міжнародному дріжджовому конгресі (Awaji Island, Japan, 2016), X Міжнародному студентсько-науковому таборі «New commercial and ecological food from Romania and Poland» (Орадея, Румунія, 2016), XXXIII-му Міжнародному спеціалізованому симпозиумі по дріжджах ISSY33 (Корк, Ірландія, 2017), VII Міжнародній Вейгелівській конференції (Львів, Україна, 2017), Міжнародній конференції «Non-conventional yeasts: from basic research to application» (Жешув, Польща, 2018), Міжнародній конференції “Advances in Microbiology and Biotechnology” (Львів, Україна, 2018), VI-ому Українському конгресі з клітинної біології із міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019), VIII Міжнародній Вейгелівській конференції «Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology» (Лодзь, Польща, 2019).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 27 наукових робіт, серед яких 4 статті у міжнародних виданнях Scopus, 1 розділ у монографії, а також 22 тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить наступні розділи: "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки" та "Список використаних джерел". Дисертацію викладено на 163 сторінках друкованого тексту, з них основна частина займає 115 сторінок. Робота містить 32 рисунки та 7 таблиць. Список використаної літератури налічує 201 джерело.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

**Огляд літератури.** У цьому розділі викладено дані про метаболізм ксилози у різних мікроорганізмів, зосереджуючи увагу на метилотрофних термотолерантних дріжджах *O. polymorpha*, а також описано різноманітні підходи метаболічної інженерії для покращення ефективності алкогольної ферментації ксилози у дріжджів. Основний акцент спрямовано на особливості імпорту ксилози та факторах захисту

клітин в стресових умовах алкогольної ферментації. Викладена також інформація про метаболізм та механізми регуляції продукції глутатіону. На основі огляду наукової літератури обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертації.

**Матеріали і методи досліджень.** Штами дріжджів *O. polymorpha* культивували при 37 °С та 45 °С на багатому середовищі YPD [Ausubel *et al.*, 2003] або мінеральному синтетичному середовищі YNB «Difco». Бактерії *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  вирощували при 37 °С на багатому середовищі LB [Ausubel *et al.*, 2003]. Агаризовані середовища для дріжджових і бактерійних штамів містили 2 % агар. Трансформацію дріжджів *O. polymorpha* та бактерій *E. coli* проводили методом електропорації як описано раніше [Faber *et al.*, 1994; Sambrook *et al.*, 2001]. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів та бактерій проводили як описано для *S. cerevisiae* [Johnston *et al.*, 1994] та *E. coli* [Sambrook *et al.*, 2012]. Виділення плазмідної ДНК, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюцію фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК ендонуклеазами рестрикції, дефосфорилування «липких» (комплементарних) кінців ДНК, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікацію фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) здійснювали за Sambrook *et al.*, 2001. Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). Для ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою ПЛР використовували синтетичні олігонуклеотидні праймери фірм «IDT Technologies» або «Sigma» (США). Сумарну РНК з клітин дріжджів виділяли з використанням набору GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit with DNase I (EURx Ltd., Польща). Кількісну ПЛР (ПЛР у реальному часі) проводили на приладі Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System з використанням набору SG OneStep qRT-PCR kit (EURx Ltd., Польща), РНК як матриці та ROX як барвника для нормалізації інтенсивності свічення інтеркалюючих барвників типу Syber Green згідно інструкцій виробника. Кратну зміну амплікона в дослідному зразку у порівнянні з контрольним зразком вимірювали в двох повторах, що були нормовані за контрольним геном *ACT1* і розраховували з використанням порівняльного методу Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Активності транскетоксилази [Sevostyanova *et al.*, 2006], трансальдолази [Bergmeyer *et al.*, 2008], дигідроксиацетонсинтази [Waites *et al.*, 1983] визначали як описано раніше. Для проведення алкогольної ферментації глюкози/ксилози дріжджову біомасу *O. polymorpha* нарощували на середовищі YPD/YPX (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 4% глюкоза/ксилоза) упродовж однієї/двох діб на орбітальному шейкері (200 об./хв) при температурі 37 °С та 45 °С. Клітини осаджували центрифугуванням та промивали водою. Біомасу (2 мг/мл клітин) переносили в середовище YNB з додаванням 10% глюкози або ксилози. Алкогольну ферментацію проводили на орбітальному шейкері при температурі 37 °С чи 45 °С за умов обмеженої аерації (140 об./хв) упродовж 5 діб. Експерименти алкогольної ферментації проводили щонайменше у трьох повторах. Біомасу дріжджів визначали нефелометрично на спектрофотометрі Helios  $\gamma$  ( $\lambda = 600$  нм, кювета 1 см), розраховуючи суху вагу за калібрувальною кривою.

У роботі використовувалися бази даних *S. cerevisiae* - [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org); *O. polymorpha* - <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo2.home.html>. Аналіз нуклеотидної послідовності ДНК проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); Oligonucl. Properties Calculator ([www.basic.northwe](http://www.basic.northwe)

stern.edu/biotools/oligoalc.html) та пакету програм доступних на <http://www.bioinformatics.org/sms/>. Для порівняльного аналізу амінокислотних та нуклеотидних послідовностей використовували програми доступні на [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Пошук подібності амінокислотних послідовностей проводили, використовуючи мережевий сервіс BLAST Національного центру біотехнологічної інформації (Bethesda, MD, USA), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Концентрації етанолу, ксилози, глюкози, ксиліту та оцтової кислоти в середовищі визначали за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (PerkinElmer, Series 2000, USA), використовуючи іонообмінну колонку Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA). Як рухомих фаз використовували 4 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при швидкості потоку 0,6 мл/хв при температурі колонки 30 °С. Концентрацію етанолу в середовищі також визначали за допомогою набору «Алкотест» [Gonchar *et al.*, 2001]. Визначення дихальної активності клітин після культивування в мінеральному середовищі з глюкозою або ксилозою проводили за допомогою кисневого електроду Кларка та приладу для визначення кисню Biological Oxygen Monitor YSI Model 5300 (Yellow Springs Instruments Co., США).

Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (M), середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) та стандартну похибку (m). Для визначення істотної різниці між варіантами використовували критерій Стюдента ( $t_r$ ) при 5% рівні достовірності кореляційного зв'язку (p) [Мельниченко *та ін.*, 2006]. Результати дослідів представляли як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. Статистично достовірною вважали різницю при значеннях  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Конструювання рекомбінантних штамів *O. polymorpha* здатних до одночасного споживання глюкози та ксилози за умов високотемпературної алкогольної ферментації.** Одним з можливих шляхів отримання штамів дріжджів *S. cerevisiae* з покращеними параметрами алкогольної ферментації є білкова інженерія гексозних транспортерів для збільшення афінності до ксилози і зменшення до глюкози, оскільки транспорт ксилози інгібується за наявності глюкози в середовищі. У геномі штама дикого типу *O. polymorpha* був виявлений функціональний гексозний транспортер Hxt1 з високою гомологією до низькоафінних гексозних транспортерів Hxt1 та Hxt3 *S. cerevisiae*. Внаслідок експресії гена *HXT1* *O. polymorpha* спостерігалось відновлення росту штама *S. cerevisiae* з делецією гексозних транспортерів [Stasyk *et al.*, 2008].

Під час виконання дисертаційної роботи для підвищення питомої швидкості поглинання ксилози було створено модифікований Hxt1 *O. polymorpha* шляхом заміни аспарагіну на аланін в положенні 358. Крім того, одним із основних сигнальних шляхів для деградації низькоспорідненого транспортера гексози Hxt1 є убіквітин-залежний протеоліз. Об'єктом убіквітинування є залишки лізину у N-кінцевому домені вищевказаного Hxt1 білка. Відповідні залишки лізину в положенні 8, 9 та 30 було ідентифіковано як сайти убіквітинування з високою ймовірністю, тому з метою запобігання деградації транспортера з цитоплазматичної мембрани за відсутності глюкози їх було замінено на залишки аргініну. Отримані плазмідні вектори було введено в геном штама *O. polymorpha hxt1Δ* та досліджено вплив



модифікацій на ефективність одночасного споживання ксилози і глюкози за умов обмеженої аерації при 45 °С в рідкому мінімальному середовищі YNB з 10% ксилози і 10% глюкози; 5% ксилози та 5% глюкози; 7% ксилози та 3% глюкози, а також 3% ксилози та 7% глюкози. Останнє співвідношення цукрів є найбільш наближеним до їхнього вмісту в гідролізатах лігноцелюлози [Нон *et al.*, 2017; Моусес *et al.*, 2016].

Під час бродіння у всіх тестових середовищах спостерігалось послідовне споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу. Штам дикого типу утилізував глюкозу в повному обсязі, в той час як споживання ксилози відбувалося лише на 40% - 60%. Мутант *hxt1Δ* практично не утилізував глюкозу та ксилозу незалежно від співвідношення цих цукрів у середовищі, внаслідок чого не утворював етанол в умовах алкогольної ферментації (Рис. 1).

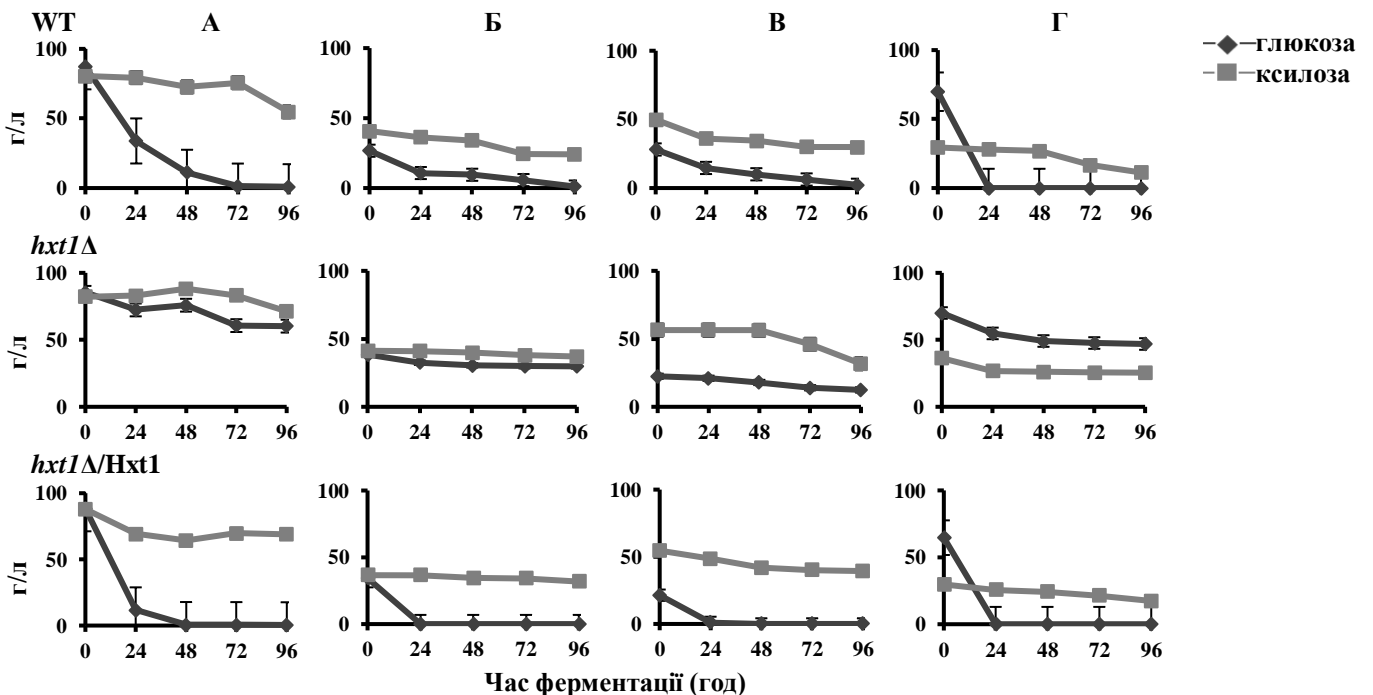


Рис. 1. Споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманим трансформантом *hxt1Δ/Hxt1*, під час зброджування ксилози та глюкози при 45°C. А) 10% ксилоза/10% глюкоза Б) 5% ксилоза/5% глюкоза В) 7% ксилоза/3% глюкоза Г) 7% глюкоза/3% ксилоза.

Внаслідок посилення експресії нативного *HXT1* в геномі *hxt1Δ* мутанта спостерігалось відновлення здатності до споживання цукрів, проте, швидкість споживання ксилози у штамів WT та *hxt1Δ/Hxt1* суттєво не відрізнялася. Натомість, швидкість споживання ксилози штамом *hxt1Δ/Hxt1* була нижчою порівняно із штамами, що містять модифіковані версії *HXT1* (Рис. 1, Рис. 2). Динаміка споживання цукрів штамом *hxt1Δ/Hxt1\_K* суттєво не відрізнялася від штамів WT та *hxt1Δ/Hxt1*. Найбільш інтенсивне споживання ксилози здійснювалося штамом *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*. Проте, найбільш виражене спільне споживання глюкози та ксилози спостерігалось у штаму *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K*, який містив обидві модифікації, зокрема при концентрації 7% глюкози та 3% ксилози, вміст ксилози зменшився за 1 добу до  $14,100 \pm 0,175$  г/л при вихідному вмісті  $30,5 \pm 0,35$  г/л.

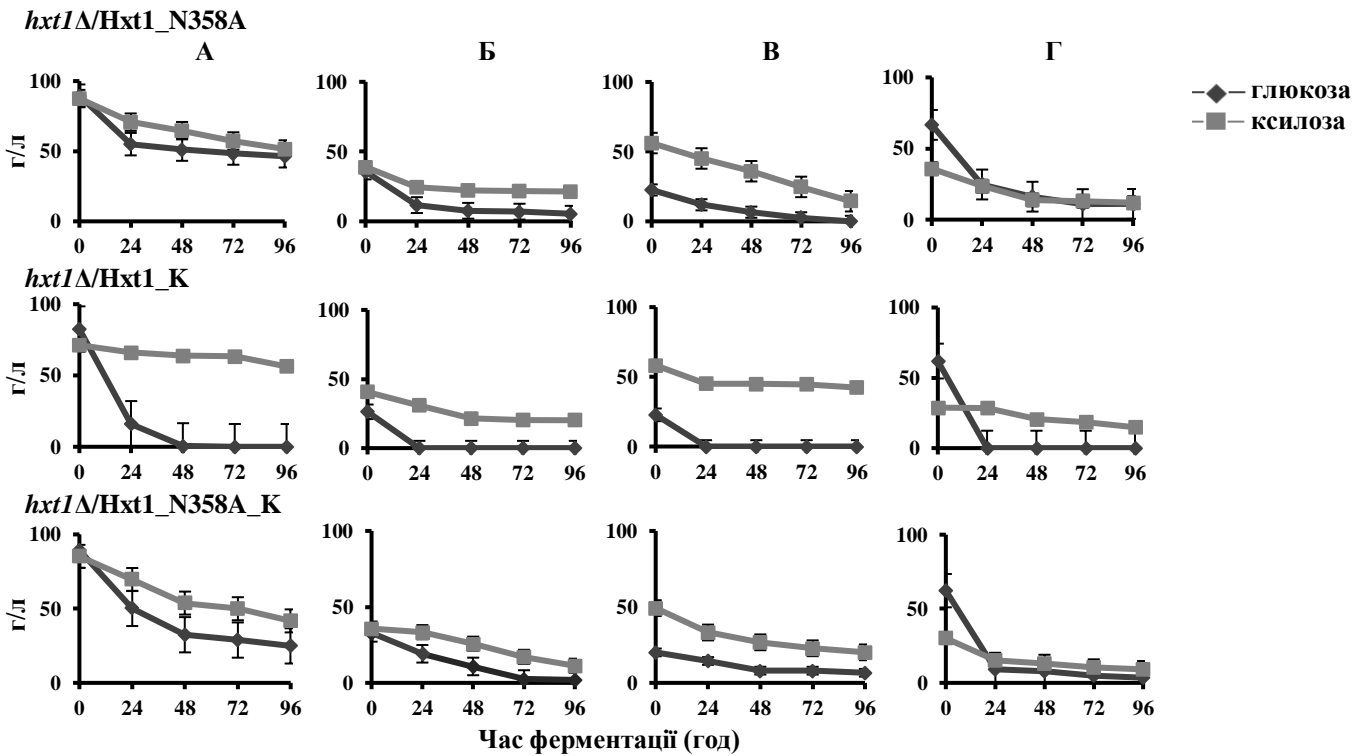


Рис. 2. Споживання глюкози та ксилози отриманими трансформантами *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час зброджування ксилози та глюкози при 45°C. А) 10% ксилоза/10% глюкоза Б) 5% ксилоза/5% глюкоза В) 7% ксилоза/3% глюкоза Г) 7% глюкоза/3% ксилоза.

Протягом 24 год бродіння в середовищі із 7% глюкози та 3% ксилози, штам *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* споживав 87% глюкози та 50% ксилози, тоді як *hxt1Δ/Hxt1\_N358A* лише 65% глюкози та 38% ксилози (Рис. 3).

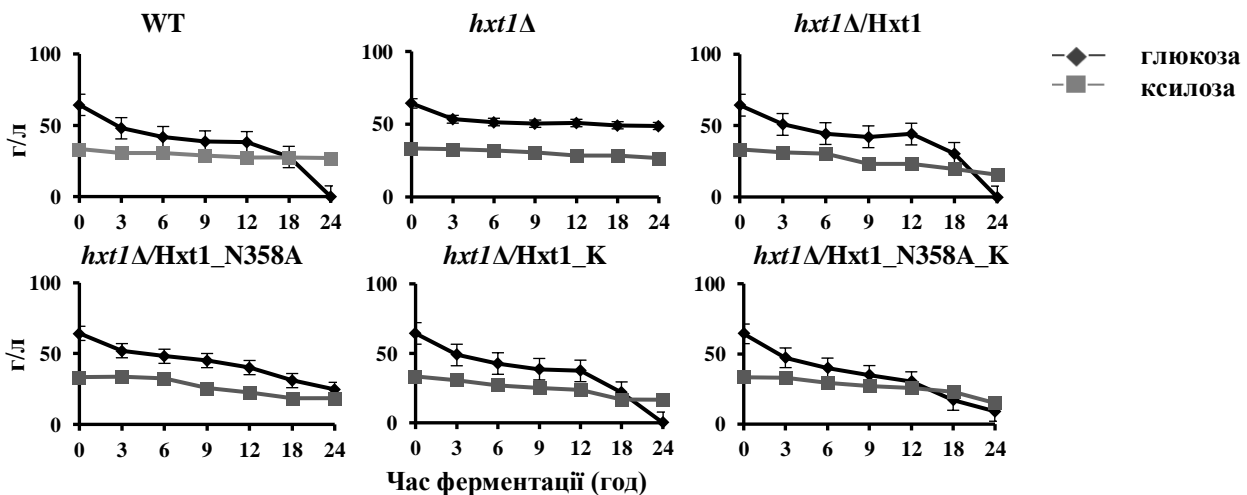


Рис. 3. Споживання глюкози та ксилози штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманими трансформантами *hxt1Δ/Hxt1*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A*, *hxt1Δ/Hxt1\_K*, *hxt1Δ/Hxt1\_N358A\_K* під час спиртового бродіння при 45°C у середовищі з 7% глюкози та 3% ксилози протягом 24 год.

Незважаючи на різницю в динаміці споживання цукрів між трансформантами з модифікаціями *HXT1*, всі вони характеризувалися підвищеною продукцією етанолу порівняно зі штамом дикого типу. Втім, під час ферментації протягом 24 год було показано, що більшу кількість етанолу накопичують штами *hxt1Δ*/Hxt1\_K та *hxt1Δ*/Hxt1\_N358A\_K (Рис. 4). Проте, *hxt1Δ*/Hxt1\_K за 24 год споживав всю глюкозу і лише незначну кількість ксилози, в той час як *hxt1Δ*/Hxt1\_N358A\_K спільно використовував обидва цукри з середовища. Тому, для подальших дослідження був обраний варіант Hxt1\_N358A\_K.

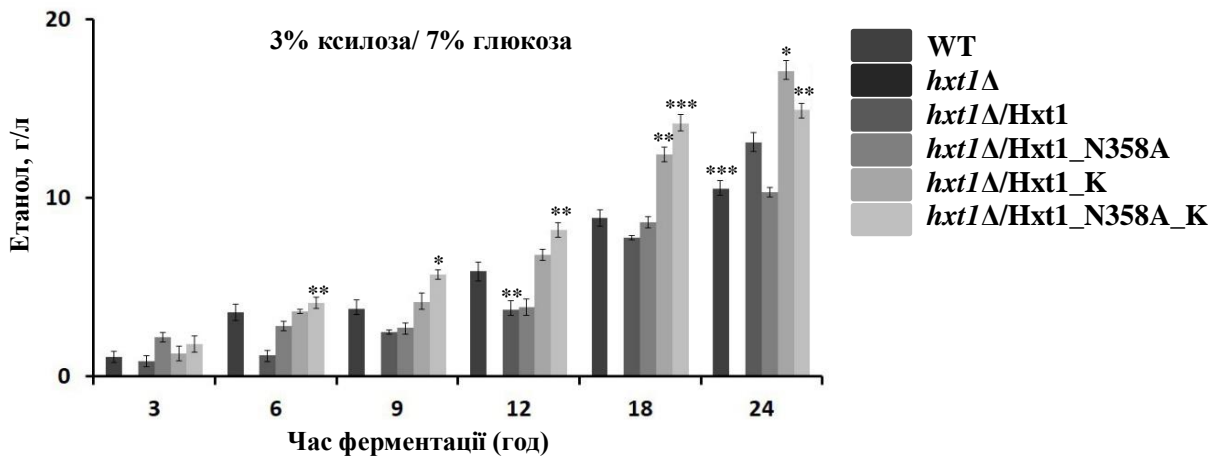


Рис. 4. Продукція етанолу штамом дикого типу (WT), мутантом *hxt1Δ* та отриманими штамами *hxt1Δ*/Hxt1, *hxt1Δ*/Hxt1\_N358A, *hxt1Δ*/Hxt1\_K, *hxt1Δ*/Hxt1\_N358A\_K під час спиртового бродіння при 45°C у середовищі з 7% глюкози та 3% ксилози; \* – статистично достовірні зміни  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

З метою порівняння тривалості локалізації нативної та модифікованої форм транспортера Hxt1 у цитоплазматичній мембрані було здійснено злиття Hxt1 та Hxt1\_N358A\_K на С-кінці з флуоресцентним репортерним білком GFP. За допомогою флуоресцентної мікроскопії проведено оцінку локалізації в мембрані штаму *hxt1Δ* *O. polymorpha* злитих білків із нативним та модифікованим транспортером через 24 год, 48 год, 72 год та 96 год культивування за аеробних умов у мінімальному середовищі із 2% ксилози або 2% глюкози (Рис. 5).

Встановлено, що Hxt1\_N358A\_K-GFP локалізувався у плазматичній мембрані навіть після 96 год культивування в мінімальному середовищі з ксилозою, в той час як нативний Hxt1-GFP швидко деградував та видалявся з плазматичної мембрани. Різниця в тривалості локалізації модифікованої форми білка спостерігалася також і в середовищі з глюкозою, проте, під час росту на глюкозі в обох випадках білок Hxt1 зазнавав більш швидкої деградації. Таким чином, мутагенез трьох залишків лізину в Hxt1 має вагомий вплив на стабільність мембранної локалізації Hxt1. У свою чергу більш тривала локалізація білка в мембрані за умов алкогольної ферментації у середовищі з ксилозою та глюкозою ймовірно обумовлює поліпшену кінетику споживання ксилози та, як наслідок, підвищення продукції етанолу.

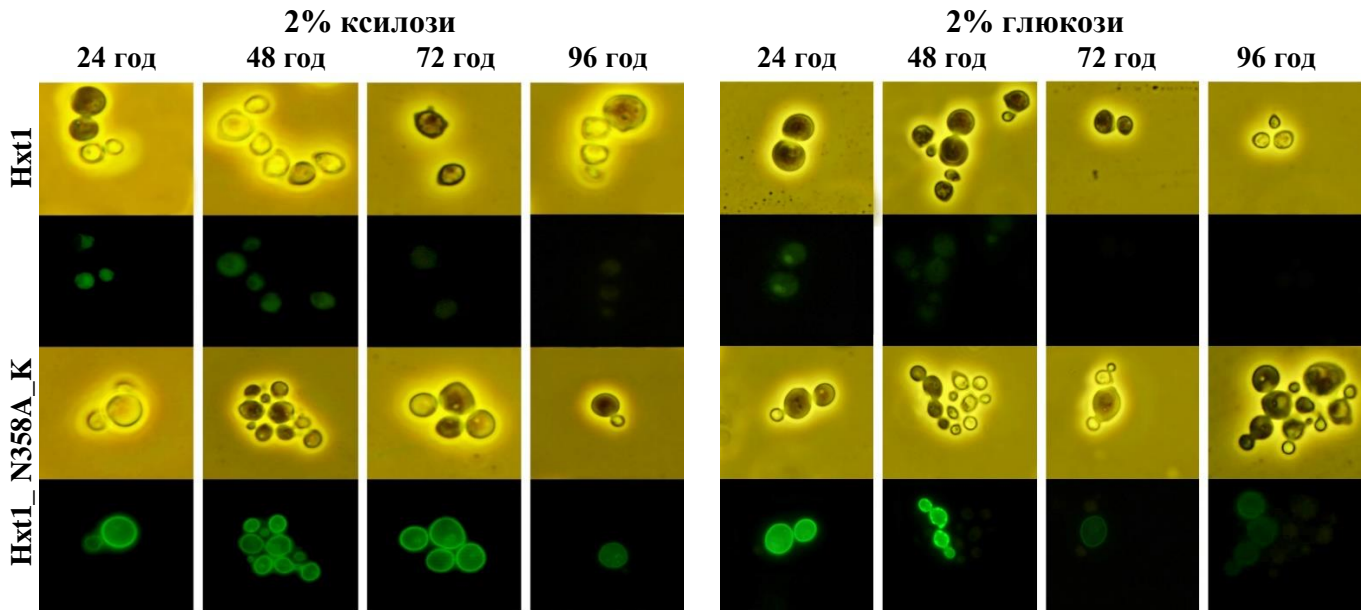


Рис. 5. Мембранна локалізація Hxt1 та Hxt1\_N358A\_K, злитих з зеленим флуоресцентним білком GFP, під час росту у мінімальному середовищі з 2% ксилозою або 2% глюкозою.

Спираючись на джерела літератури, було вирішено як альтернативний спосіб підвищення ефективності транспорту ксилози здійснити експресію гетерологічних транспортерів в *O. polymorpha*. Для посилення експресії модифікованих гетерологічних транспортерів Gal2 та Hxt7 *S. cerevisiae*, а також Hxt1 *O. polymorpha* було сконструйовано відповідні вектори та введено в генوم покращеного продуцента етанолу з ксилози *O. polymorpha* (VERcat8Δ) [Ruchala *et al.*, 2017]. Аналізуючи здатність одночасного споживання обох субстратів та продукцію етанолу за умов коферментації, встановлено, що у батьківського штаму (VER/cat8Δ) та штаму із модифікацією Hxt7 (VERcat8Δ/Hxt7\_N370F) спостерігається інгібування транспорту ксилози глюкозою. Вихідний штам VERcat8Δ протягом 48 год споживав усю наявну в тестовому середовищі глюкозу та лише 30% ксилози. Поглинання обох цукрів штамом із модифікованим Hxt7 відбувалося подібно до батьківського штаму (Рис. 6).

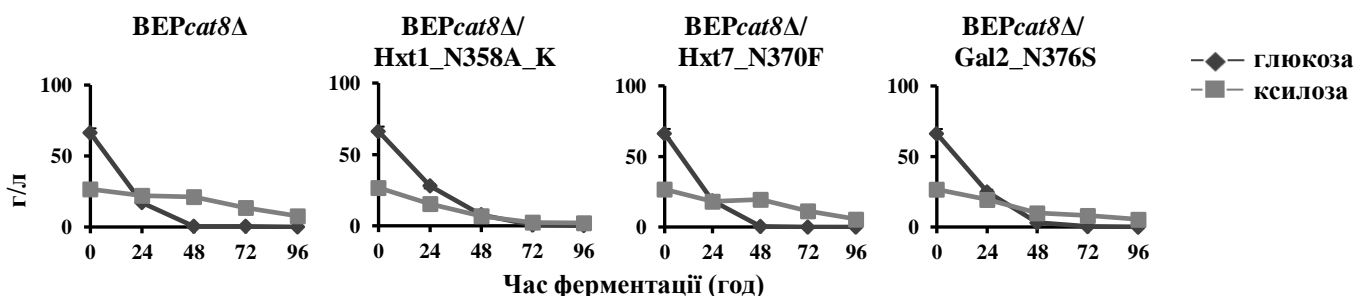


Рис. 6. Споживання глюкози і ксилози батьківським штамом VER/cat8Δ та отриманими штамами Hxt1\_N358A\_K, Gal2\_N376S, Hxt7\_N370F під час спиртового бродіння у середовищі з 7% глюкозою та 3% ксилозою.

У той же час штами, що містили модифіковані Hxt1 і Gal2, споживали на 73% і 62% більше ксилози, відповідно. Під час зброджування 7% глюкози та 3% ксилози штамом *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* вміст ксилози зменшився на 4 добу до  $2,020 \pm 0,013$  г/л при вихідному вмісті  $27,01 \pm 0,40$  г/л. Рівень продукції етанолу штамом *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* був вищим на 50% порівняно із батьківським штамом на 48 год ко-ферментації глюкози та ксилози, а також перевищував продукцію етанолу штамами, що містили модифіковані транспортери Gal2 та Hxt7, на 22% та 10%, відповідно. Продукція етанолу штамом *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* досягала  $27,560 \pm 0,127$  г/л етанолу на другу добу ферментації у порівнянні з *VERcat8Δ*, рівень продукції етанолу якого становив  $18,230 \pm 0,096$  г/л. Крім того, штам *VERcat8Δ/Hxt1\_N358A\_K* мав найвищий вихід етанолу 0,35 г етанолу/г цукру, що на 30% більше порівняно з *VERcat8Δ* (Табл. 1).

Таблиця 1

**Продуктивність і вихід етанолу у рекомбінантних штамів *O. polymorpha* порівняно із реципієнтним штамом *VER/cat8Δ* на 48 год ко-ферментації глюкози та ксилози (7:3) при 45 °С**

Штами	Етанол, г/л	Вихід етанолу, г/г спожитої ксилози	Швидкість продукції етанолу, г/г біомаси/год	Продуктивність утворення етанолу, г/л/год
<i>VERcat8Δ</i>	$18,230 \pm 0,096$	$0,256 \pm 0,009$	$0,165 \pm 0,004$	$0,380 \pm 0,016$
<i>VERcat8Δ/Hxt1_N358A_K</i>	$27,560 \pm 0,127$	$0,347 \pm 0,014$	$0,212 \pm 0,008$	$0,574 \pm 0,029$
<i>VERcat8Δ/Gal2_N376S</i>	$22,590 \pm 0,089$	$0,310 \pm 0,011$	$0,188 \pm 0,004$	$0,471 \pm 0,019$
<i>VERcat8Δ/Hxt7_N370F</i>	$25,440 \pm 0,065$	$0,319 \pm 0,014$	$0,203 \pm 0,007$	$0,530 \pm 0,024$

Таким чином, експресія модифікованого ендogenousного транспортера Hxt1 в *O. polymorpha* мала найбільш виражений позитивний вплив на одночасне споживання цукрів та продукцію етанолу під час ко-ферментації глюкози та ксилози порівняно з експресією гетерологічних транспортерів Gal2 або Hxt7 *S. cerevisiae*.

**Дослідження ролі пероксисомних ферментів в метаболізмі та алкогольної ферментації ксилози у дріжджів *O. polymorpha*.** Нещодавно було з'ясовано, що порушення біогенезу пероксисом у дріжджів *O. polymorpha* інгібує ріст та ефективність алкогольної ферментації на середовищі з ксилозою як джерелі Карбону [Kurylenko *et al.*, 2020]. Серед ферментів асоційованих з цими органелами було обрано для дослідження дигідроксиацетонсинтазу або пероксисомну транскетолазу (ДАС, кодується геном *DAS1*), що залучена в метаболізм метанолу та виявлений в базі даних *O. polymorpha*, гомолог гена *TAL1 S. cerevisiae*, що відповідає за пероксисомну трансальдолазу (кодується геном *TAL2*). З попередніх досліджень відомо, що делеційні штами *das1Δ* та *tal2Δ* демонструють значне зниження продукції етанолу з ксилози, хоча здатні нормально рости на ксилозі як джерелі Карбону. Крім того, посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* у штамі дикого типу *O. polymorpha* обумовлювало підвищення продукції етанолу з ксилози у 2,3 та 1,9 раза, відповідно [Kurylenko *et al.*, 2018]. З метою подальшого підвищення ефективності алкогольної ферментації ксилози було посилено експресію відповідних генів у геномі попередньо

отриманого штаму *O. polymorpha* ВЕР/*cat8Δ* [Ruchala *et al.*, 2017]. Реконбінантні штами з посиленою експресією генів *DAS1* та *TAL2* були використані для дослідження здатності продукувати етанол під час культивування за умов обмеженої аерації в мінімальній середовищі з 10% ксилозою при 45 °С (Рис. 7).

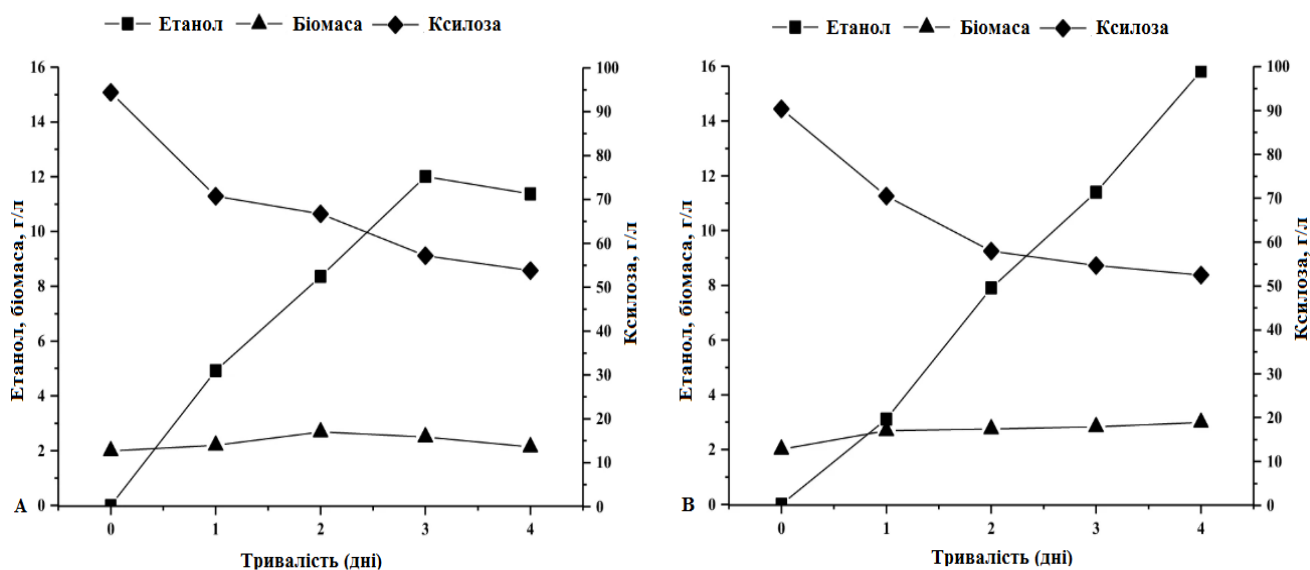


Рис. 7. Продукція етанолу, накопичення біомаси та споживання ксилози під час спиртового бродіння ксилози при 45 °С штамами *O. polymorpha* ВЕР/*cat8Δ* (А) та ВЕР/*cat8Δ*/*DAS1*/*TAL2* (В).

Посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH<sup>-</sup>/XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/*cat8Δ* обумовлювало підвищення продукції етанолу з ксилози на 29% (Рис. 7). У штаму ВЕР/*cat8Δ*/*DAS1*/*TAL2* продукція етанолу зростає до 16 г/л у той час як вихідний штам накопичував близько 12,5 г/л, а вихід етанолу становив 0,39 г/г ксилози (Табл. 2), що є найкращим результатом серед усіх реконбінантних штамів *O. polymorpha*.

Таблиця 2

**Продуктивність і вихід етанолу у реконбінантних штамів *O. polymorpha* порівняно з реципієнтним штамом ВЕР/*cat8Δ* під час ферментації ксилози при 45 °С**

Штами	Етанол, г/л	Вихід етанолу, г/г спожитої ксилози	Швидкість продукції етанолу, г/г біомаси/год	Продуктивність утворення етанолу, г/л/год
ВЕР/ <i>cat8Δ</i>	12.510±0,134	0,340±0,015	0,091±0,003	0,205±0,009
ВЕР/ <i>cat8Δ</i> / <i>DAS1</i> / <i>TAL2</i>	16.132±0,141	0,393±0,017	0,092±0,004	0,210±0,005

Отже, надекспресія пероксисомних ферментів дигідроксиацетонсинтази та трансальдолази призводить до покращення здатності перетворювати ксилозу до етанолу у метилотрофних термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*, однак механізм дії пероксисомних ферментів на алкогольну ферментацію ксилози залишається невідомим і потребує подальшого дослідження.

**Конструювання штамів дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону.** Механізми регуляції біосинтезу глутатіону у метилотрофних дріжджів (зокрема у *O. polymorpha*) та забезпечення гомеостазу цього трипептиду у клітині залишаються в багатьох аспектах недостатньо дослідженими. Проте, було встановлено, що посилення експресії як гена *GSH2*, що кодує  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетазу, так і *MET4*, що кодує транскрипційний активатор генів біосинтезу цистеїну (попередник синтезу глутатіону), підвищує вміст внутрішньоклітинного глутатіону у метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* [Ubiyovovk *et al.*, 2011; Grabek-Lejko *et al.*, 2011]. У даній роботі було здійснено ко-експресію гена *MET4* в попередньо отриманому штамі з посиленою експресією гена *GSH2* (*mcGSH2*) з метою подальшого підвищення вмісту глутатіону в клітинах дріжджів *O. polymorpha*. В результаті посилення експресії генів *GSH2* та *MET4* спостерігалось значне підвищення рівня глутатіону під час культивуванні у середовищі YNB. Максимальний вміст глутатіону в клітинах *mcGSH2/MET4(pGAP)* спостерігався через 96 год, проте на 48 год продукція глутатіону штамом *mcGSH2* перевищувала штам *mcGSH2/MET4(pGAP)*. Вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* сягав 837 нмоль/мг білка, що у 1,8 та 4,4 раза вище, ніж у штамів *mcGSH2* та WT, відповідно. Максимальна внутрішньоклітинна продукція глутатіону штамом *mcGSH2/MET4(pGAP)* становила 2167 мг/л, що у 5 і 1,8 раза більше порівняно з WT та *mcGSH2*. В перерахунку на суху біомасу вміст глутатіону в штамі *mcGSH2/MET4 (pGAP)* становив 134 мг/г сухої біомаси клітин (Табл. 3).

Таблиця 3

**Продукція глутатіону штамми *O. polymorpha* (WT, *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4 (pGAP)* під час культивування у середовищі YNB за аеробних умов при 37 °C**

Штами	GSH, нмоль/мг білка	GSH, мг/л (мкмоль/л)	GSH, мг/г сухої біомаси клітин
WT <sup>a</sup>	191,9±19,2	418,1±37,6 (1393,00±125,37)	39±3,9
mcGSH <sup>b</sup>	475,5±038	1223,0±61,1 (4076,7±203,8)	85±6,6
mcGSH/MET4 (pGAP) <sup>c</sup>	837,0±58,5	2167±65,3 (7223,3±216,7)	134,0±9,4

a – 72 год культивування; b – 48 год культивування; c – 96 год культивування.

На наступному етапі дослідження рекомбінантні штамми *mcGSH2/MET4(pGAP)* та *mcGSH2* були перевірені на здатність продукувати глутатіон у напівпромислових (пілотних) умовах культивування [Yurkiv *et al.*, 2018]. Вміст внутрішньоклітинного глутатіону штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* в 5 разів перевищував вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2* на 25 год культивування, досягаючи 249 нмоль/мг білка. Також протягом 71 год культивування вміст глутатіону в клітинах штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* був суттєво вищим порівняно із штамом *mcGSH2*. Проте, на 71 год обидва штамми нагромаджували глутатіону 420 нмоль /мг білка, що є нижчим значенням порівняно із культивуванням в лабораторних умовах (Рис. 8). Таку відмінність можна пояснити складом мінерального середовища, що використовували під час культивування у біореакторі, порівняно з YNB, яке використовували в лабораторних умовах.



Однак, вміст глутатіону протягом перших 24 год культивування був значно вищим для штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* порівняно з батьківським штамом (249 та 55 нмоль/мг білка, відповідно), тоді як вміст глутатіону для штаму *mcGSH2/MET4(pGAP)* порівняно з вихідним штамом в колбах, був незначно покращений (179 та 274 нмоль/мг білка, відповідно).

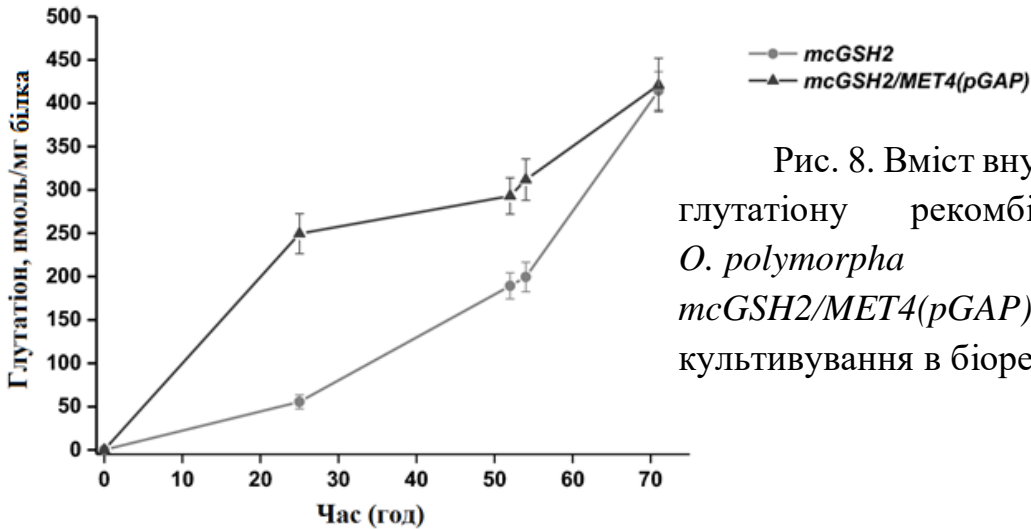


Рис. 8. Вміст внутрішньоклітинного глутатіону рекомбінантних штамів *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* під час культивування в біореакторі при 37 °С.

Отже, рекомбінантні штами *O. polymorpha* з ко-експресією генів *GSH2* та *MET4* характеризуються суттєво підвищеною продукцією глутатіону порівняно зі штамом дикого типу *O. polymorpha* DL-1 за лабораторних умов культивування. В результаті проведених досліджень отримано штам *O. polymorpha mcGSH2/MET4(pGAP)*, який характеризується одним з найкращих показників продукції глутатіону в порівнянні з іншими дріжджовими продуцентами цього трипептиду, які на сьогодні відомі.

**Дослідження ролі глутатіону в алкогольній ферментації у дріжджів *O. polymorpha*.** Глутатіон є однією з основних сполук, що беруть участь в захисті клітин від численних стресових чинників, однак його роль в захисті клітин дріжджів від етанольного стресу, а також вплив на продукцію етанолу під час зброджування глюкози і ксилози у дріжджів *O. polymorpha* дотепер залишалися нез'ясованими.

Для дослідження впливу вмісту внутрішньоклітинного глутатіону на ефективність алкогольної ферментації було використано ряд штамів *O. polymorpha*: штами з посиленою експресією гена *GSH2* (гомолог гена *GSH1 S. cerevisiae*, що кодує  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетазу, перший фермент біосинтезу GSH) [Ubiyovok et al., 2002] та штам із ко-експресією *GSH2* та *MET4* (ген, що кодує транскрипційний фактор залучений в регуляцію метаболізму цистеїну, який є попередником GSH). Для контролю були використані прототрофні та ауксотрофні за лейцином штами дикого типу *O. polymorpha* DL-1. Штами *O. polymorpha mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* під час алкогольної ферментації ксилози при 45 °С характеризувалися у 3 рази підвищеною продукцією етанолу порівняно із штамом дикого типу на 2 добу культивування за умов обмеженої аерації. Підвищення продукції етанолу супроводжувалося незначним зростанням швидкості споживання ксилози. Під час ферментації ксилози при 37 °С у штамів *mcGSH2* та *mcGSH2/MET4(pGAP)* не



спостерігалось утворення підвищеної кількості етанолу порівняно із штамом дикого типу, проте динаміка споживання ксилози була незначно покращена (Рис. 9(А)).

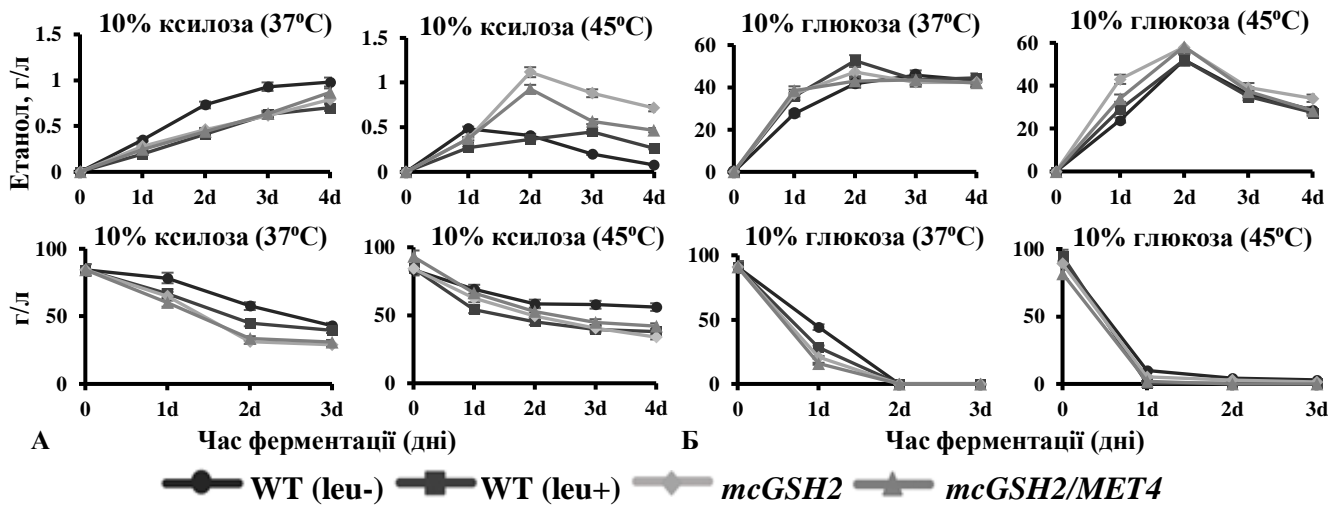


Рис. 9. Продукція етанолу та споживання глюкози під час ферментації штамів *O. polymorpha* з посиленою експресією генів *GSH2* (*mcGSH2*) і *MET4* (*mcGSH2/MET4*).

На відміну від високотемпературної алкогольної ферментації ксилози, під час ферментації глюкози у рекомбінантних штамів та штамів дикого типу не спостерігалось суттєвих відмінностей в продукції етанолу та динаміці споживання глюкози (Рис. 9 (Б)).

Отже, підвищення вмісту внутрішньоклітинного глутатіону має позитивний вплив на продукцію етанолу дріжджами *O. polymorpha* під час зброджування ксилози при 45 °С на відміну від 37 °С. Отримані результати вказують на важливість глутатіону для продукції етанолу в умовах підвищеної температури як стресового чинника та наявності ксилози, що є менш ефективним для зброджування джерелом Карбону порівняно з глюкозою.

## ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено оригінальні підходи та сконструйовано рекомбінантні штами-надпродуценти етанолу та глутатіону на основі метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*. Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Сконструйовано модифіковані форми транспортера Hxt1 *O. polymorpha* із заміною залишків лізину на N-кінці білка (заміна сайтів убіквітинування) та заміною аспарагіну на аланін в положенні 358. Отримано штами дріжджів *O. polymorpha* з посиленою експресією ізоформ гена *HXT1*, що кодують нативну або модифіковані форми транспортера Hxt1.
2. За допомогою флуоресцентної мікроскопії підтверджено, що мутагенез Hxt1 обумовлює збільшення тривалості локалізації цього білка в мембрані клітин *O. polymorpha* за наявності ксилози як вуглецевого субстрату.
3. Сконструйовано штами дріжджів *O. polymorpha* з модифікованим геном *HXT7*

*S. cerevisiae* в положенні 370 шляхом заміни аспарагіну на фенілаланін та з модифікованим геном *GAL2 S. cerevisiae* в положенні 376 шляхом заміни аспарагіну на серин та досліджено вплив здійснених модифікацій транспортерів Hxt1, Hxt7 та Gal2 на ефективність споживання ксилози та глюкози дріжджами *O. polymorpha* в умовах високотемпературної алкогольної ферментації.

4. Встановлено, що введення модифікованих транспортерів Hxt1 *O. polymorpha* в геном покращеного продуцента етанолу з ксилози обумовлює одночасне споживання обидвох цукрів за умов високотемпературної алкогольної ферментації 7% глюкози та 3% ксилози. Продукція етанолу рекомбінантного штаму досягає  $27,560 \pm 0,127$  г/л на другу добу ферментації в порівнянні з вихідним штамом, рівень продукції етанолу якого становить  $18,230 \pm 0,096$  г/л.

5. Здійснено посилення експресії генів *DAS1* та *TAL2* в геномі штаму 2EthOH/*XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/cat8Δ*, отриманого методами метаболічної інженерії та класичної селекції з підвищеною продукцією етанолу з ксилози. Отриманий рекомбінантний штам 2EthOH/*XYL1m/XYL2/XYL3/BrPA/Δcat8/DAS1/TAL2* накопичував етанолу в 1,3 раза більше у порівнянні з батьківським штамом. Максимальний титр утвореного етанолу досягав 16 г/л, що є найкращим результатом серед усіх рекомбінантних штамів *O. polymorpha*.

6. Сконструювано штами дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону за рахунок надекспресії гена транскрипційного активатора Met4 та гена першого фермента біосинтезу глутатіону *GSH2*. Встановлено позитивний вплив підвищеного рівня внутрішньоклітинного глутатіону на продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації у *O. polymorpha*.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast. *Microbial Cell Factories*. 2020;19(1):96. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, провела аналіз та узагальнення отриманих даних, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

2. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Stasyk O, Dmytruk O, Dmytruk K, Sibirny A. Peroxisomes and peroxisomal transketolase and transaldolase enzymes are essential for xylose alcoholic fermentation by the methylotrophic thermotolerant yeast, *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11(1):197. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації).

3. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Fickers P, Sibirny A. Gene of the transcriptional activator *MET4* is involved in regulation of glutathione biosynthesis in the methylotrophic yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. *FEMS Yeast Res*. 2018;18(2):133. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних та оформленні публікації)

4. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Martynyuk N, Skorohod V, Sibirny A. Development of glutathione production technology based on designed active

yeast overproducers. *Science and innovation*. 2015;11(5):63-65. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних)

5. Yurkiv M, Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Construction of the efficient glutathione producers in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds: Monograph*. University of Rzeszow. 2015;11(5):323-332. (Здобувач спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних)

6. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for construction of the high-temperature ethanol producers from xylose. X International Students Scientific Camp «New commercial and ecological food from Romania and Poland»; 2016 Feb. 11-14; Oradea, Romania. P. 144

7. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Krasovska O, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. New targets for improvement of high-temperature xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P. 66.

8. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A, Improvement of xylose alcoholic fermentation by derepression of two peroxisome localized enzymes in yeast *Hansenula polymorpha*. 6th International Young Scientists Conference „Human. Nutrition. Environment”; 2016 April 21 – 22; Rzeszow, Poland. P.126.

9. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Metabolic engineering of *Ogataea polymorpha* for improving high-temperature xylose alcoholic fermentation. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts; 2016 Sept. 11-15; Awaji, Island, Japan. P. 256-257

10. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sibirny A. The effect of derepression of two peroxisome localized enzymes on high-temperature xylose alcoholic fermentation in yeast *Hansenula polymorpha*. International Symposium on Cell Biology jointly with 5<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology; 2016 October 2-6; Odessa, Ukraine. P. 53.

11. Shevchuk N., Kolisnyk Y, **Vasylyshyn R**. Modification of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose by the yeast *Ogataea polymorpha* during high-temperature alcoholic fermentation. XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and progress of biology”; 2017 April 25-27; Lviv, Ukraine. P. 203-204

12. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Improvement of xylose utilization during high-temperature xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* by engineering of the hexose transporter Hxt1. 33rd International Specialised Symposium on Yeast; 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 27.

13. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Studying the role of cytosolic transketolase and transaldolase in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 33rd International Specialised Symposium on Yeast; 2017 June 26-29; Cork, Ireland. P. 25.

14. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Studying the role of pentose phosphate pathway in xylose metabolism and fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 7th Congress of European Microbiologists; 2017 July 9-13; Valencia, Spain. P. 189-190

15. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sybirny A. Studying the role of transketolase and transaldolase with cytosolic and peroxisomal localization in the yeast *Ogataea polymorpha*. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; 2017 вересня 11-15; Одеса, Україна. С. 48-49
16. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Role of peroxisomal and cytosolic transketolase and transaldolase in xylose alcoholic fermentation in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 42.
17. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Engineering of the hexose transporter Hxt1 for improved utilization of xylose during high-temperature xylose alcoholic fermentation in the yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. 7th International Weigl Conference; 2017 September 26-29; Lviv, Ukraine. P. 166.
18. Shevchuk N, **Vasylyshyn R**, Kolisnyk Ya. Engineering of yeast *Ogataea polymorpha* with increased expression of modified hexose transporters. XIV International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and Progress of biology"; 2018 April 10-12; Lviv, Ukraine. P. 221-222.
19. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Bratiychuk D, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Role of oxidative and non-oxidative parts of pentose phosphate pathway in xylose alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha*. Non-Conventional Yeasts: from basic research to application; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 80.
20. **Vasylyshyn R**, Shevchuk N, Kurylenko O, Dmytruk K, Sybirny A. Improvement of xylose alcoholic fermentation in yeast *Ogataea polymorpha* by modifications of hexose transporters Non-Conventional Yeasts; 2018 May 15-18; Rzeszow, Poland. P. 141.
21. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of the yeast *Ogataea polymorpha* with expression of the modified hexose transporters. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology"; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 30.
22. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. The role of pentose phosphate pathway in xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology"; 2018 October 29-31; Lviv, Ukraine. P. 28.
23. Kurylenko O., Ruchala J., **Vasylyshyn R.**, Dmytruk K., Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in regulation of xylose metabolism and fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.65.
24. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Daugelavičius R, Dmytruk K, Sibirny A.. Engineering of the hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose during high-temperature alcoholic fermentation. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine. P.82.
25. Kurylenko O, Ruchala J, **Vasylyshyn R**, Dmytruk K, Sibirny A. Identification of transcriptional factors involved in regulation of xylose fermentation in the yeast *Ogataea polymorpha*. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.98.

26. **Vasylyshyn R**, Kurylenko O, Shevchuk N, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of hexose transporters in the yeast *Ogataea polymorpha* for improved utilization of xylose. 8th International Weigl Conference: Human Welfare and Infectious Diseases in a New Microbiome Research Area. Microorganisms in industrial and medical biotechnology; 2019 June 26-28; Lodz, Poland. P.136.

27. Kurylenko O, **Vasylyshyn R**, Ruchala J, Dmytruk K, Sibirny A. Evaluation of transcriptional factors involved in the regulation of glucose and xylose metabolism and fermentation in yeast *Ogataea polymorpha*. 8th Congress of European Microbiologists; 2019 July 7-11; Glasgow, Scotland. P. 782.

## АНОТАЦІЯ

**Василишин Р.В. Конструювання поліпшених продуцентів етанолу та глутатіону у дріжджів *Ogataea polymorpha*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 – Мікробіологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена отриманню штамів дріжджів *O. polymorpha* з підвищеним рівнем продукції етанолу з ксилози та штамів з підвищеним вмістом внутрішньоклітинного глутатіону.

З метою підвищення питомої швидкості поглинання ксилози та зниження спорідненості до глюкози, вперше було створено модифіковану форму транспортера Hxt1 *O. polymorpha* шляхом заміни аспарагіну на аланін в положенні 358. Крім того, залишки лізину на N-кінці Hxt1, що є потенційними сайтами убіквітинування, було замінено на залишки аргініну для запобігання швидкої деградації транспортера.

Здійснено посилення експресії генів, що кодують пероксисомні ферменти транскетолазу Das1 (дигідроксиацетонсинтаза) та трансальдолазу Tal2 в геномі рекомбінантного штаму *O. polymorpha* з покращеними параметрами алкогольної ферментації ксилози. Встановлено, що внаслідок посилення експресії генів *DAS1* і *TAL2* продукція етанолу з ксилози зростає на 30%.

Завдяки додатковому посиленню експресії гена *MET4* в попередньо сконструйованому штамі із посиленою експресією гена *GSH2*, вдалося підвищити вміст внутрішньоклітинного глутатіону в штамів *O. polymorpha* в 5 разів порівняно із штамом дикого типу. Отримані результати свідчать про залучення транскрипційного фактора Met4 в регуляцію біосинтезу глутатіону у дріжджів *O. polymorpha*.

**Ключові слова:** біоетанол, лігноцелюлоза, ксилоза, *Ogataea polymorpha*, пероксисомні ферменти, глутатіон.

## SUMMARY

**Vasylyshyn R.V. Construction of improved ethanol and glutathione producers in yeast *Ogataea polymorpha*. – Manuscript.**

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 03.00.07 – Microbiology. – Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

The dissertation is devoted to the development and application of metabolic engineering approaches that provide obtaining *Ogataea polymorpha* strains with improved efficiency of ethanol production from xylose and increased glutathione production.

To increase the specific xylose uptake rate and decrease affinity to glucose the modified Hxt1 was engineered in *O. polymorpha* by substitution of asparagine to alanine at position 358. Furthermore, N-terminal lysine residues of Hxt1 predicted to be the target of ubiquitination were replaced for arginine residues [Nijland *et al.*, 2014; Nijland *et al.*, 2016]. The modified versions of Hxt1 were overexpressed in *hxt1Δ O. polymorpha* mutant and the efficiency of xylose and glucose co-utilization during high-temperature xylose fermentation was studied. The kinetics of consumption of both sugars during mixed sugar fermentation with different ratio of xylose and glucose was observed. The retention of the mutated Hxt1 versions at the cytoplasmic membrane was studied using fluorescent reporter GFP and compared to the native one. The modified version of Hxt1 able to improve efficiency of glucose and xylose co-consumption was integrated into genome of the available *O. polymorpha* recombinant strain with improved ethanol production during high-temperature alcoholic fermentation [Vasylyshyn *et al.*, 2020].

In this study genes encoding the peroxisomal enzymes transketolase Das1 and transaldolase Tal2 were overexpressed in the best obtained *O. polymorpha* recombinant strain with improved parameters of xylose alcoholic fermentation. The productivity of ethanol synthesis in the obtained strains was studied during alcoholic fermentation and it was shown that overexpression of *DAS1* and *TAL2* genes leads to the improvement of ethanol production from xylose by 30%, reaching 16 g/L ethanol [Kurylenko *et al.*, 2018].

Thermotolerant methylotrophic yeast *O. polymorpha* with naturally high glutathione content and resistance to various types of stress are also considered as promising strains for genetic modification and construction of a competitive producer of this tripeptide.

The *GSH2* gene encodes the first enzyme of glutathione biosynthesis in yeast *O. polymorpha* [Ubiyvovk *et al.*, 2002]. The overexpression of *GSH2* gene due to multicopy integration or under control of a strongly regulated promoter of alcohol oxidase results in improvement of glutathione production in the yeast *O. polymorpha* [Ubiyvovk *et al.*, 2011a]. Additional expression of the *MET4* gene, which is involved in the regulation of sulfate assimilation in sulfur-containing amino acids, led to increase of the intracellular glutathione by 5 times as compared to the wild-type strain, reaching 2167 mg/L. A strain with overexpressed *GSH2* and *MET4* genes was able to produce 5 times more glutathione as compared to a strain with overexpression only of *GSH2* gene during cultivation for 25 hours in a bioreactor. Data of this study show the importance of *MET4* gene coding for transcription activator involved in sulfur metabolism in yeasts for regulation of glutathione biosynthesis in *O. polymorpha* [Yurkiv *et al.*, 2018].

Obtained results are important for understanding the genetic control of xylose metabolism in yeast, and can be used to further increase the efficiency of alcoholic fermentation. In addition, the results show the construction of *O. polymorpha* strain, which is characterized by one of the best level of glutathione production as compared to the known yeast producers of this tripeptide and indicate the importance of glutathione for high-temperatures xylose alcoholic fermentation.

**Key words:** bioethanol, *Ogataea polymorpha*, lignocellulose, xylose, peroxisomal enzymes, glutathione.

Підписано до друку 22.12.2020  
Формат 60x84/16. Папір офсетний.  
Друк на різнографі. Зам. №22/12-1  
Ум. друк арк. 0,9  
Наклад 100 прим.

Друк ФОП Король І.В.  
м. Львів, вул. Гнатюка, 17  
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924  
Код ДРФО 2814706601  
витяг з реєстру платників єдиного податку  
№1713073400422 від 28.02.2017